

研究报告

一株高效 DEHP 降解菌的分离、鉴定及其降解特性

严佳丽¹ 陈湖星¹ 杨杨² 张凯¹ 王丽¹ 熊丽^{1*} 耿辉¹ 刘德立¹

(1. 华中师范大学 生命科学学院 湖北省遗传调控与整合生物学重点实验室 湖北 武汉 430079)

(2. 暨南大学 生命科学学院 广东省水体富营养化与赤潮防止重点实验室 广东 广州 510632)

摘要:【目的】分离得到高效的邻苯二甲酸二乙基己基酯(DEHP)降解菌。【方法】采用富集培养法筛选分离菌株,并对菌株进行驯化;通过PCR扩增得到其16S rRNA和gyrB基因序列,进行同源序列分析及分子系统发育树的构建,同时结合形态学观察和生理生化实验对菌株进行初步鉴定;采用高效液相色谱(HPLC)分析菌株对DEHP的降解特性。【结果】分离得到一株能以DEHP为唯一碳源和能源生长的菌株,命名为HS-NH1,初步鉴定其为戈登氏菌(*Gordonia* sp.)。菌株HS-NH1最适的生长和降解条件为30℃、pH 7.0,在此条件下,该菌株60 h内能够将浓度为500 mg/L的DEHP降解90%以上。高效液相色谱(HPLC)分析表明,菌株HS-NH1在降解DEHP过程中产生了一种重要的中间代谢产物——邻苯二甲酸。底物广谱性试验证明,菌株HS-NH1能够有效地利用多种常见的邻苯二甲酸酯(PAEs)与芳香族衍生物。【结论】筛选得到了一株DEHP降解菌*Gordonia* sp. HS-NH1,该菌降解效率高,具有良好的底物广谱性,在邻苯二甲酸酯类化合物的污染治理中将会有一定的应用潜力。

关键词: 邻苯二甲酸二乙基己基酯(DEHP), 微生物降解, gyrB 基因, 戈登氏菌属, 邻苯二甲酸

Isolation and characterization of a highly efficient DEHP-degrading bacterium

YAN Jia-Li¹ CHEN Hu-Xing¹ YANG Yang² ZHANG Kai¹ WANG Li¹ XIONG Li^{1*}
GENG Hui¹ LIU De-Li¹

(1. Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan, Hubei 430079, China)

(2. Guangdong Key Laboratory of Eutrophication and Red Tide Prevention, College of Life Science, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

Abstract: [Objective] We isolated and identified di(2-ethylhexyl) phthalate-degrading strains. [Methods] We isolated and domesticated the strain by gradient enrichment culture. We identified the strain by 16S rRNA gene and gyrB gene sequence analysis, combined with morphological, physiological and biochemical characterization. And we analyzed the degradation characteristics of the strain using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). [Results] A strain (named HS-NH1)

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31071653, 31371893); 中央高校基本科研业务费专项项目(No. CCNU12A02001); 水体富营养化与赤潮防治广东省普通高校重点实验室(暨南大学)开放基金项目(No. J201305)

*通讯作者: Tel: 86-27-67863314; 信箱: xionglily@mail.ccnu.edu.cn

收稿日期: 2013-09-30; 接受日期: 2013-11-18; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-11-26

with DEHP-degrading activity was obtained and identified as *Gordonia* sp.. The optimum temperature and pH for growth and degradation of *Gordonia* sp. HS-NH1 were 30 °C and 7.0 respectively, strain HS-NH1 was able to almost degrade 500 mg/L di(2-ethylhexy) phthalate to above 90% within 60 hours. One of the major metabolites of di(2-ethylhexy) phthalate degradation were identified as phthalic acid by HPLC. A substrate utilization test showed that HS-NH1 was also able to utilize many other common phthalates. **[Conclusion]** A bacterial strain with a high di(2-ethylhexy) phthalate-degrading efficiency was obtained, and the strain may have a potential application in dealing with the pollution caused by phthalate esters.

Keywords: Di(2-ethylhexy) phthalate (DEHP), Microbial degradation, *gyrB* gene, *Gordonia* sp., Phthalic acid

邻苯二甲酸二乙基己基酯 [Di(2-ethylhexy) phthalate, DEHP], 属于邻苯二甲酸酯类化合物 (Phthalic acid ester, PAEs, 又称酞酸酯), 是塑料工业最主要的增塑剂(软化剂)之一, 也是农药、染料、去污剂的载体以及诸多化妆品、纺织品的生产原料, 广泛用于食品包装材料、容器、医疗器械以及儿童玩具等领域^[1]。由于 PAEs 在塑料及其制品中呈游离状态, 极易释放进入环境, 目前广泛存在于大气、水体、土壤以及生物体中^[2], 极容易通过呼吸、食品、常用物品的接触等途径在人体中富集^[3]。DEHP 能够对机体造成生殖毒性、发育毒性、神经毒性、多器官癌变等多种损伤^[4-5], 因此环境监控组织, 包括美国环保署(EPA)和中国国家环境监测中心(CNEMC)都已将它列为优先控制污染物^[6]。

PAEs 在自然界中存在水解、光解等自发的理化降解; 但是这种理化降解作用十分微弱, 例如 DEHP 的水解半衰期达 2 000 年, 光解半衰期也需要 105 年; 可见自然理化降解并不是 PAEs 降解的主要途径, 研究表明生物降解才是 PAEs 在环境中降解的主要途径^[7]。国内外已就 PAEs 的微生物降解做了大量的工作, 主要是高效降解菌株的筛选和降解动力学研究、以及酶促降解特性和降解途径等。国内外已报道的 PAEs 降解主要有分枝杆菌 (*Mycobacterium* sp.)、诺卡氏菌 (*Nocardia* sp.)、红球菌 (*Rhodococcus* sp.)、假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)、芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)、寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas* sp.) 和戈登氏菌 (*Gordonia* sp.) 等^[8-12]。由于 DEHP 结构式中存在着一个苯环和两

个相邻的长侧链, 导致其具有较低的水溶性和化学稳定性, 且空间位阻较大^[13], 相比短链邻苯二甲酸酯类较难降解, 因此目前有关 DEHP 降解的报道较少。本研究从长期受生活污水及 PVC 材料污染的武汉市南湖底泥中筛选得到了一株能彻底降解 DEHP 的菌株 *Gordonia* sp. HS-NH1, 并研究了其降解特性。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 主要试剂: 邻苯二甲酸(2-乙基己基)酯 DEHP, 上海阿拉丁试剂; 邻苯二甲酸(2-乙基己基)酯 DEHP 标准品, 美国 Sigma 公司; 乙酸乙酯国药集团化学试剂有限公司; 色谱级甲醇, 德国 Fisher 公司; 酵母粉 (Yeast extract) 和蛋白胨 (Tryptone), 英国 OXOID 公司; 细菌 DNA 提取试剂盒, 上海赛百盛基因技术有限公司; 琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒, 爱思进生物技术有限公司; *Taq* DNA 聚合酶和 dNTP, Fermentes; 引物合成和测序由南京金斯瑞生物技术有限公司完成; 其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器: 高效液相色谱仪, 美国瓦里安公司; UV1100 紫外可见分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; 电泳仪, 北京六一仪器厂; 旋转蒸发器, 上海亚荣生化有限公司; PCR 仪、小型高速冷冻离心机(5415 型), 德国 Eppendorf 公司。

1.2 培养基配制

无机盐培养基(g/L): NH_4Cl 2.0, NaCl 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KH_2PO_4 0.2, K_2HPO_4 1.0, H_2O 1.0 L,

痕量元素 0.5 mL, 调整 pH 为 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。固体培养基加琼脂 18 g/L。痕量元素溶液(g/L): $\text{CaSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4.0, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7.0, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 7.0, $\text{CoCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.4, CaCl_2 2.0, H_2O 1.0 L, 调节 pH 为 7.0。

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, NaCl 10, 酵母粉 5, H_2O 1.0 L, 调 pH 为 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min, 固体培养基加琼脂 18 g/L。

1.3 菌株的分离

样品取自武汉市受塑料严重污染的南湖。将样品以 1.0% 的量接种, 于以 DEHP 为唯一碳源的液体无机盐培养基中, 采用梯度压力驯化法进行培养, 通过稀释涂平板法初筛, 选择生长状态良好, 形态不同的菌落, 采用多次平板划线法复筛, 直至分离得到纯的单菌落。

1.4 菌株鉴定

1.4.1 细菌形态观察及其生理生化特征鉴定: LB 琼脂平板上划线接种, 30 °C 恒温培养 48 h, 观察细菌生长情况及菌落特征, 革兰氏染色(按照革兰氏染色试剂盒进行), 光学显微镜下观察细菌形态和染色特征。参考《伯杰氏细菌鉴定手册》和《常见细菌鉴定手册》^[14-15]进行部分生理生化特征鉴定, 主要包括甲基红试验、接触酶试验、淀粉水解试验及部分生化鉴定等。

1.4.2 菌株的 16S rRNA 基因序列测定及分子系统发育树的构建: 通过细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取菌株总 DNA 并以之为模板, 对 16S rRNA 基因序列进行 PCR 扩增。引物序列: FC27: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'; RC1492: 5'-CTACGGTTACCTTGTTACGAC-3'^[16]。PCR 采用 50 μL 反应体系, 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 54 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 并通过 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化, 测序, 序列用 BLASTn 进行相似性搜索和同源性比对, 采用 ClustalX 1.8 进行序列匹配分析, 通过 MEGA 5.0 软件, 采用邻接法(Neighbor-Joining

method) 构建发育树。

1.4.3 菌株的 *gyrB* 基因序列测定及分子系统发育树的构建: *gyrB* 基因是普遍存在于细菌中编码促旋酶 B 亚单位的基因, 该基因进化速率快, 每 100 万年的平均碱基替换率为 0.7%–0.8%, *gyrB* 基因弥补了非蛋白编码基因 16S rDNA 无法区分近缘种的缺陷^[17]。因此以细菌基因组 DNA 为模板, 对 *gyrB* 基因序列进行 PCR 扩增。引物序列: UP_1F: 5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNNGGNGNAARTTYGA-3'; UP_2R 5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCACRTCNCGRTCNCGTCAT-3'^[18]。PCR 采用 50 μL 反应体系, 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 54 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 并通过 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化, 测序, 序列用 BLASTn 进行相似性搜索和同源性比对, 采用 ClustalX 1.8 进行序列匹配分析, 通过 MEGA 5.0 软件, 采用邻接法(Neighbor-Joining method)构建发育树。

1.5 菌株的特性研究

1.5.1 菌株的生长与降解特性: 将分离纯化得到的菌株接种于富集培养基中, 培养 24 h 后收集菌体, 在无菌条件下用 pH 为 7.4 的 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 用同样的缓冲液将菌体重悬, 调菌悬液 OD_{600} 至 1.0 备用。称取一定量 DEHP 溶解于甲醇制得 10 g/L DEHP 母液, 取一定量的 DEHP 母液加入 150 mL 培养瓶中, 待甲醇挥发后, 加入 50 mL 无机盐培养基, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min 后, 加入 1 mL 菌悬液, 培养 60 h 后取样分析。分别考察了在初始 DEHP 浓度为 500 mg/L, 摇床转速 180 r/min 条件下, 不同温度、pH 值对菌株生长和 DEHP 降解的影响, 设定温度分别为 20、25、30、35、40, pH 值分别为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0。通过 OD_{600} 评价菌株 HS-NH1 的生长情况; 通过降解率和残留率评价 DEHP 的降解情况。降解率的计算方法为降解率=(初始 DEHP 浓度-剩余 DEHP 浓度)/初始 DEHP 浓度 $\times 100\%$, 残留率的计算方法为残留率=剩余

DEHP 浓度/初始 DEHP 浓度×100%。以含 500 mg/L DEHP 且未加入菌悬液的无机盐培养基为对照 ,所有试验重复 3 次。

1.5.2 底物广谱性试验：将菌悬液按 1.0%接种于分别含有 500 mg/L 邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、邻苯二甲酸二辛酯(DOP)、邻苯二甲酸二异辛酯(DEHP)、邻苯二甲酸丁基苄基酯(BBP)、邻苯二甲酸(PA)、原儿茶酸(PCA)及水杨酸的无机盐培养基中 , 30 ℃、180 r/min 避光振荡培养 60 h , 观察菌株的生长状况 , 所有试验重复 3 次。

1.6 分析方法

DEHP 残留量及其降解中间产物的检测 :通过反向 HPLC 检测 DEHP 残留量及其中间产物^[19]。向进行降解实验的培养瓶中加入 20 mL 乙酸乙酯 , 振荡 15 min 后 , 12 000 r/min 离心 3 min , 使有机相和水相分离 , 水相被重复萃取两次 , 合并有机相 , 通过旋转蒸发使乙酸乙酯蒸干 , 剩余物质用甲醇定容至 10 mL。取 1 mL 溶液经 0.22 μm 一次性滤膜过滤 , 取 20 μL 滤液注入高效液相 HPLC 系统。色谱柱为 5 μm Eclipse XDB-C18 , 色谱条件 : 柱温 25 ℃ , 流动相为甲醇:超纯水(90:10 , 体积比) , 流速为 1.0 mL/min , 检测波长为 228 nm , 所有试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 菌株 HS-NH1 的形态学及生理生化特性

经富集培养、分离筛选到几株能利用 DEHP 为唯一碳源和能源生长的细菌 , 其中菌株 HS-NH1 生长较好。菌株 HS-NH1 的菌落呈橙红色 , 边缘不规则 , 表面干燥微凸 , 不透明。光学显微镜下观察 , 细菌为直或稍弯的短杆状 , 细菌单个或不规则群体出现 , 常呈 V 字形生长 , 不产生芽孢。菌株 HS-NH1 的部分生理生化特性研究结果表明 , 该菌为革兰氏阳性菌 , 好氧 , V.P 反应和接触酶反应呈阳性 , 甲基红试验和淀粉水解反应呈阴性 , 能发酵多种糖类和氨基酸 , 具体特征如表 1 所示。

2.2 菌株 HS-NH1 16S rRNA 基因系统发育学分析

经 PCR 扩增获得一段长 1 389 bp 的序列 , 其 GenBank 登录号为 KF688474 , 结果分析表明该菌株与放线菌戈登氏菌属的 *Gordonia* sp. KTR9 (NR074569.1) , *Gordonia terrae* strain C-6 (EU590659.1) , *Gordonia* sp. BF-B-F (EU306602.1) , 和 *Gordonia terrae* strain CC-S2d (AY771330.1)等 16S rRNA 基因相似性均为 99% , 系统发育分析如图 1 所示 , 菌株 HS-NH1 与多株戈登氏菌在同一个分支。

2.3 菌株 HS-NH1 *gyrB* 基因系统发育学分析

经 PCR 扩增获得一段长 1 264 bp 的序列 , 其 GenBank 登录号为 KF688475 , 结果分析表明 , 该菌株与 *Gordonia terrae* strain CC-S2d (AY972065.1) *gyrB* 基因相似性达 99% , 而与其他菌株 *gyrB* 基因相似性均在 99%以下 , 系统发育分析如图 2 所示 , 菌株 HS-NH1 与 *Gordonia terrae* strain CC-S2d 同在一分支。结合形态特征、生理生化特征、

表 1 菌株 HS-NH1 部分生理生化特征 Table 1 Some physiological and biochemical properties of HS-NH1	
检测指标 Test	菌株 HS-NH1 HS-NH1
氧气 Oxygen	+
革兰氏染色 Gram stain	+
V.P 试验 V.P test	+
甲基红试验 Methyl red test	-
淀粉水解反应 Amylohydrolysis test	-
接触酶反应 Catalase test	+
D-甘露糖 D-mannitose	+
葡萄糖 Glucose	+
蔗糖 Sucrose	+
-乳糖 -Lactose	-
柠檬酸 Citric acid	+
L-组氨酸 L-Histidine	+
L-甲硫氨酸 L-Methionine	-
L-酪氨酸 L-Tyrosine	+

注：+：阳性；-：阴性。
Note: +: Positive; -: Negative.

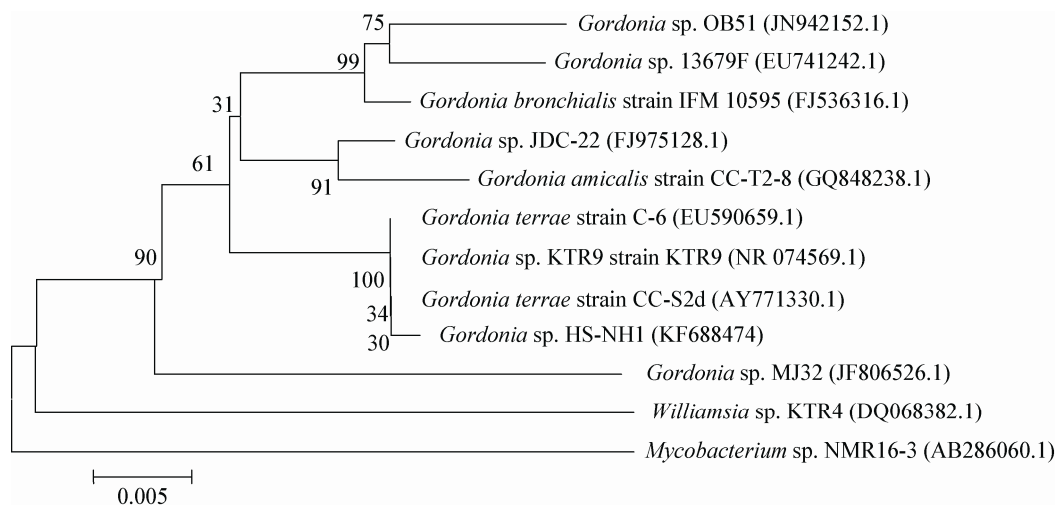


图 1 菌株 HS-NH1 的 16S rRNA 基因系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of strain HS-NH1 and related species based on 16S rRNA gene sequences

注：括号中的序号代表序列在 GenBank 中的序列号；节点上的数字表示 Bootstrap 值；刻度 0.005 表示序列偏差值。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values on Neighbor-Joining analysis of 1 000 resampled data sets. Bar 0.005 represent sequence divergence.

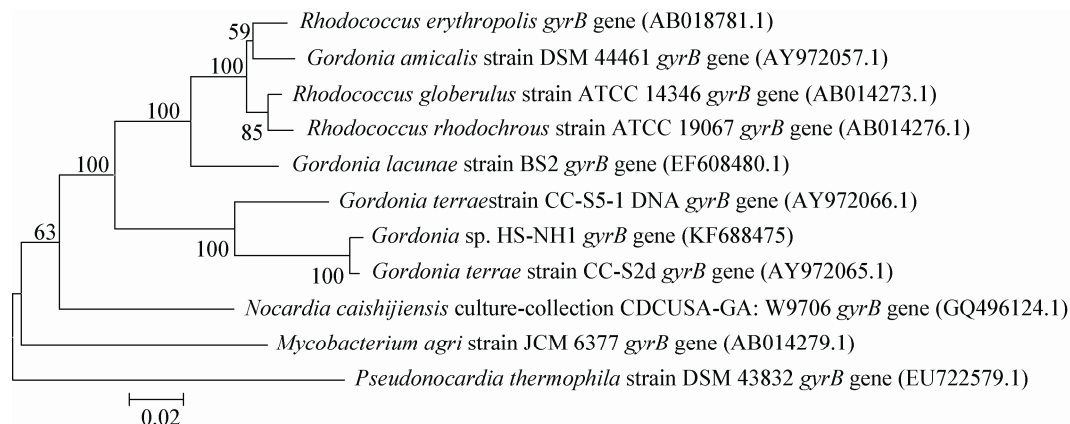


图 2 菌株 HS-NH1 的 gyrB 基因系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain HS-NH1 and related species based on gyrB gene sequences

注：括号中的序号代表序列在 GenBank 中的序列号；节点上的数字表示 Bootstrap 值；刻度 0.02 表示序列偏差值。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values on Neighbor-Joining analysis of 1 000 resampled data sets. Bar 0.02 represent sequence divergence.

16S rRNA 基因和 gyrB 基因分析，可推断菌株 HS-NH1 属于戈登氏菌属，命名为 *Gordonia* sp. HS-NH1。

2.4 菌株 HS-NH1 的生长与 DEHP 降解特性研究

2.4.1 温度对菌株生长及 DEHP 降解的影响：温度对菌株生长(OD_{600})及 DEHP 降解的影响如图 3

所示。菌株在不同温度下培养 60 h 后，分析结果表明温度对菌株 HS-NH1 生长和 DEHP 降解都有显著的影响。当培养温度在 30–35 °C 之间时 HS-NH1 生长和 DEHP 的降解情况较好；当培养温度低于 25 °C 时，菌株生长和 DEHP 降解相对缓慢；当培养温度达到 40 °C 时，菌株的生物量稍微有所

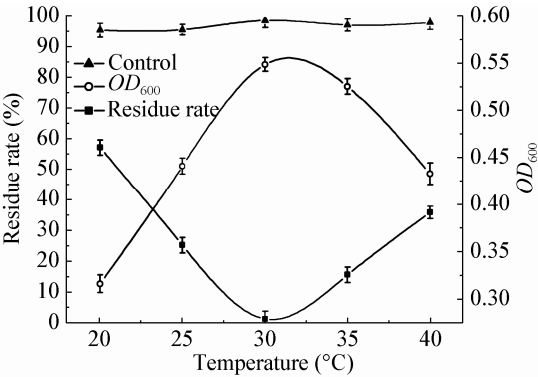


图 3 温度对 HS-NH1 生长及 DEHP 降解的影响
Figure 3 Effect of temperature on the growth of HS-NH1 and DEHP degradation
注：实验组与对照组(未接种菌悬液的无机盐培养基)在相同条件下培养并同时取样分析。
Note: Samples and sterile controls (non-inoculated MSM) were periodically analyzed in similar way.

下降,但大部分 DEHP 被降解,说明菌株 HS-NH1 能在较高温度的环境下生长。因此菌株 HS-NH1 生长及降解 DEHP 的最适温度为 30 °C。

2.4.2 初始 pH 值对细菌生长及 DEHP 降解的影响: pH 值对菌株生长(*OD*₆₀₀)及 DEHP 降解的影响如图 4 所示。菌株在不同 pH 值下培养 60 h 后,分析结果表明 pH 值对菌株 HS-NH1 生长和 DEHP 降解都有显著的影响。当初始 pH 值在 7.0–9.0 之间时 HS-NH1 生长和 DEHP 的降解情况较好;当 pH 值小于 6.0 时,菌株生长缓慢,DEHP 的降解作用也受到明显的抑制。说明菌株 HS-NH1 适合在碱性环境下生长,且最适 pH 值为 7.0。

2.5 菌株 HS-NH1 底物广谱性分析

底物广谱性实验结果如表 2 所示, *Gordonia* sp. HS-NH1 也能利用其他几种常见邻苯二甲酸酯类

化合物生长,如邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、邻苯二甲酸二辛酯(DOP)、邻苯二甲酸丁基苄基酯(BBP)等,且对支链较复长的 PAEs 如 DOP、BBP 利用较好,同时 HS-NH1 对主要的邻苯二甲酸酯代谢衍生物如邻苯二甲酸(PA),原茶儿酸(PCA)具有一定的利用能力。

2.6 DEHP 残留量及其降解中间产物的检测

为了探索菌株 HS-NH1 对 DEHP 的降解途径,通过 HPLC 检测出 DEHP 的一种主要中间代谢产物-邻苯二甲酸(PA),如图 5 所示。通过与标准浓度 DEHP、PA 高效液相色谱的保留时间对比可知,对照组(向含有 500 mg/L DEHP 的无机盐培养基中加入 HS-NH1 菌悬液后,未经振荡培养,立即提取

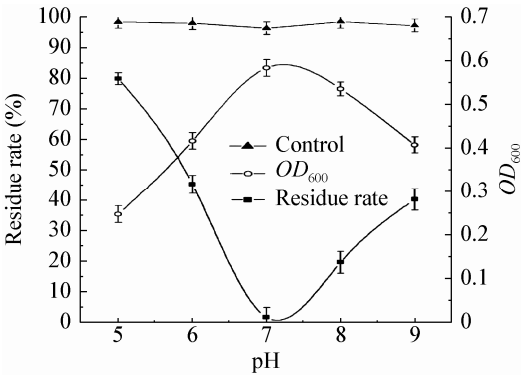


图 4 pH 值对 HS-NH1 生长及 DEHP 降解的影响
Figure 4 Effect of pH value on the growth of HS-NH1 and DEHP degradation
注：实验组与对照组(未接种菌悬液的 MSM 培养基)在相同条件下培养并同时取样分析。
Note: Samples and sterile controls (non-inoculated MSM) were periodically analyzed in similar way.

表 2 菌株 HS-NH1 的底物利用广谱性											
Table 2				Diversity of degradable substrates by strain HS-NH1							
底物	Substrate	利用情况	Utilization	底物	Substrate	利用情况	Utilization	底物	Substrate	利用情况	Utilization
	DMP		+		DOP		++		PA		+
	DEP		+		DEHP		++		PCA		+
	DBP		+		BBP		++		Salicylic acid		—

注：++：生长良好；+：能利用生长；-：不能利用生长。
Note: ++: Vigorous growth; +: Growth; -: Not growth.

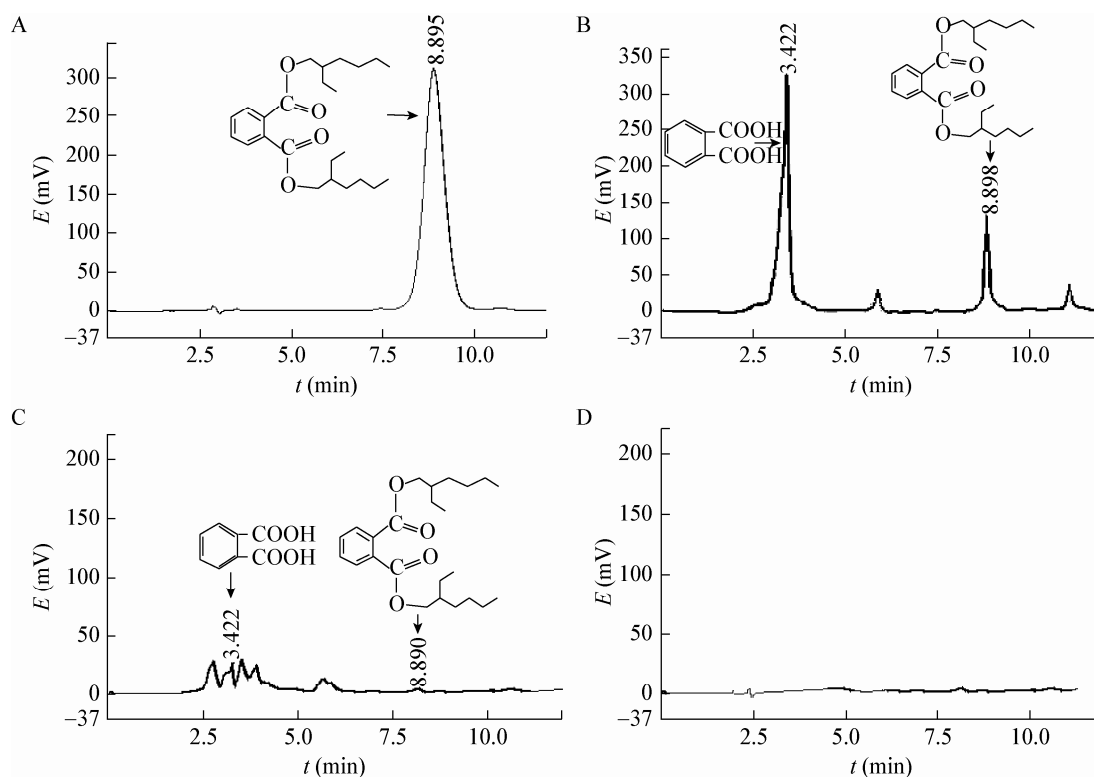


图 5 DEHP 经菌株 HS-NH1 不同时间降解后的 HPLC 检测图

Figure 5 HPLC detection image of DEHP biodegraded by HS-NH1 for different times

注：标准品检测显示 DEHP 的保留时间为 8.895，邻苯二甲酸的保留时间为 3.425。A：对照组；B：36 h；C：48 h；D：60 h。

Note: Retention time of DEHP and PA are 8.895, 3.425 respectively. A: Control; B: 36 h; C: 48 h; D: 60 h.

DEHP 检测分析)只检测到单一化合物 DEHP,而实验组(向含有 500 mg/L DEHP 的无机盐培养基中加入 HS-NH1 菌悬液后,振荡培养一定时间后,提取 DEHP 检测分析)经菌株 HS-NH1 降解 36 h 后,DEHP 显著减少,同时产生大量邻苯二甲酸;降解 48 h 后检测到极少量 DEHP,邻苯二甲酸也逐渐减少,同时产生多种中间代谢产物;降解 60 h 后几乎没有检测到 DEHP 及其中间产物,表明 DEHP 几乎被完全降解。

3 讨论

在放线菌中,戈登氏菌显示其遗传和代谢方式的多样性,该属的多个成员已成为烃类污染土壤生物修复的极具潜力的供选菌株^[20]。研究表明,部分戈登氏菌可降解或修饰芳香族和脂肪族碳氢化合物、卤化的芳香族化合物、苯并噻吩、腈、聚异戊二烯、二甲苯等物质^[20]。目前,国内外对邻苯

二甲酸酯生物降解的研究还是集中在对降解微生物优势种的鉴定筛选、降解代谢产物的鉴定以及降解机制和降解动力学等方面^[21]。邻苯二甲酸酯的生物可降解性随烷基链的变长以及分枝侧链的增加而降低,可能随着分子量的增加,会增大对生物反应的位阻效应,研究表明长链的邻苯二甲酸酯如 DHP、DEHP 等远不如 DEP、DBP 等短链的容易降解^[21]。目前报道能降解 DEHP 的菌属主要有假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)、微球菌属(*Micrococcus* sp.)、棒状杆菌属(*Corynebacterium* sp.)、鞘胺醇单胞菌属(*Sphingomonas* sp.)、纤维单胞菌属(*Cellulomonas* sp.)、糖丝菌(*Saccharothrix* sp.)、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)^[22-26]等,但并非所有菌株都能完全矿化 PAEs,部分菌株只能将 PAEs 转化成单酯,或者进一步转化成邻苯二甲酸,再或者通过不同菌株的协同作用达到完全矿化 PAEs 的目

的^[23]。2011 年,曹相生等报道 *Saccharothrix* sp. 的一个新菌种能在 48 h 内将 DEHP 浓度从 20 mg/L 降解到 2 mg/L,菌株的耐受性较差,相对降解效率较低^[25]。2005 年,秦华等报道的 *Cellulomonas* sp. DW1 可以耐受较高浓度的 DEHP,在 7 d 的时间内对摇瓶中 2 000 mg/L 的 DEHP 降解 96%,但不能证明该菌能彻底矿化 DEHP,也没有进行底物广谱性分析,不能确定该菌能够有效利用其它邻苯二甲酸酯类污染物^[26]。关于戈登氏菌降解 DEHP 的报道较少,仅在 2006 年,日本 Tuguhiro Nishioka^[27] 等发现 *Gordonia* sp. strain P8219 能在 60 h 内降解 1.5 mL/L DEHP,但仅止步于脱去了酯键形成邻苯二甲酸,并没有彻底降解 DEHP,且该报道没有对其降解特性及其降解中间产物进行分析,其重点仅在于酯酶的纯化。本文通过富集培养和压力驯化法从武汉市南湖底泥中筛选出一株 DEHP 高效降解菌 HS-NH1 并对其降解特性进行初步研究,该菌能够在 60 h 内将浓度 500 mg/L 的 DEHP 降解 90% 以上,相对于 *Gordonia* sp. strain P8219, *Gordonia* sp. HS-NH1 降解效率高,能够彻底降解 DEHP,且能有效利用其它多种常见邻苯二甲酸酯类,这将有利于有效处理环境中 PAEs 和一些芳香族衍生化合物的污染。

从形态学特征及生理生化试验结果可以看出,菌株 HS-NH1 具有放线菌的典型特征,菌株呈短杆状,革兰氏阳性,在 LB 固体平板上 37 °C 培养 24 h,菌落呈不规则形态,表面干燥等都与放线菌的生理生化指标相同。16S rRNA 基因序列进化分析结果进一步表明,菌株 HS-NH1 与多株戈登氏菌相近,并聚成一簇(图 1),由于放线菌戈登氏菌属的 16S rRNA 基因序列的保守性极高,因此较难利用此基因序列进行菌种间的区分,而 *gyrB* 基因序列分析结果进一步显示菌株 HS-NH1 与 *Gordonia terrae* strain CC-S2d 相近,推断 HS-NH1 是台式戈登氏菌一个株系。底物广谱性分析表明 *Gordonia* sp. HS-NH1 也能够有效降解其它 5 种常见的邻苯

二甲酸酯及其主要衍生物,且对支链较复杂的邻苯二甲酸酯利用较好。HPLC 检测结果表明,DEHP 降解过程中产生邻苯二甲酸,而后生成多种中间产物,最终被完全降解。推断 DEHP 首先水解生成邻苯二甲酸,邻苯二甲酸氧化开环,最终进入三羧酸循环形成 CO₂ 和 H₂O,这与骆祝华^[28]等描述的邻苯二甲酸酯的降解途径一致。这是目前有关戈登氏菌属对 DEHP 的彻底降解的首次报道,且 *Gordonia* sp. HS-NH1 的降解效率高,底物广谱性良好,培养要求较低,因此在 PAEs 和一些芳香族衍生化合物的污染治理中具有一定的应用潜力。

4 结论

(1) 从长期受邻苯二甲酸酯类化合物污染的南湖底泥中分离得到了一株能够以邻苯二甲酸二异辛酯(DEHP)为唯一碳源和能源生长的细菌 HS-NH1,经过形态学特征,部分生理生化特征和 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列系统分析,初步鉴定该菌株为戈登氏菌(*Gordonia* sp.)。

(2) 菌株 HS-NH1 的最适生长和降解条件为:温度 30 °C、pH 7.0,在此条件下,菌株 HS-NH1 能在 60 h 内对浓度为 500 mg/L 的 DEHP 降解 90% 以上,底物广谱性分析表明菌株 HS-NH1 也能利用其它多种常见的邻苯二甲酸酯类化合物。因此菌株 HS-NH1 是一株环境适应能力强,降解效率高,底物范围广的 DEHP 降解菌。

(3) 通过 HPLC 检测到 DEHP 降解过程中产生一种重要的中间代谢产物——邻苯二甲酸,且邻苯二甲酸进一步被完全降解。

参 考 文 献

- [1] 徐毅,薛山,贺稚非,等.食品包装中增塑剂 DEHP 毒性特点及迁移研究进展[J].食品工业科技,2013,34(21):385-389.
- [2] 张晓蕾,沈国明,杜琪珍.DEHP 在冬瓜果皮和果肉的累积差异及与果皮蜡质组成的关系[J].北方园艺,2011,5(16):37-40.
- [3] Adibi J, Whyatt RM, Williams PL, et al. Characterization of phthalate exposure among pregnant women assessed by repeat air and urine samples[J]. Environmental Health Perspectives, 2008, 116(4): 467-473.

- [4] Swan SH. Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2008, 108(2): 177-184.
- [5] Takashima K, Ito Y, Gonzalez FJ, et al. Different mechanisms of DEHP-induced hepatocellular adenoma tumorigenesis in wild-type and α -null mice[J]. *Journal of Occupational Health*, 2008, 50(2): 169-180.
- [6] 王文枝, 国伟, 孙利, 等. 食品包装材料中 DEHP 的危害及其在食品中的暴露评估[J]. *食品科技*, 2008, 33(4): 166-168.
- [7] 刘庆, 杨红军, 史衍玺, 等. 环境中邻苯二甲酸酯类 (PAEs) 污染物研究进展[J]. *中国生态农业学报*, 2012, 20(8): 968-975.
- [8] Wang JL, Liu P, Qian Y. Microbial degradation of di-*n*-butyl phthalate[J]. *Chemosphere*, 1995, 31(9): 4051-4056.
- [9] Jin DC, Liang RX, Dai QY, et al. Biodegradation of di-*n*-butyl phthalate by *Rhodococcus* sp. JDC-11 and molecular detection of 3,4-phthalate dioxygenase gene[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 20(10): 1440-1445.
- [10] Hiroaki I, Ayaka N, Yoshie H. Isolation and characterization of marine bacteria capable of utilizing phthalate[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(3): 1321-1325.
- [11] Wu XL, Liang RX, Dai QY, et al. Complete degradation of di-*n*-octyl phthalate by biochemical cooperation between *Gordonia* sp. strain JDC-2 and *Arthrobacter* sp. strain JDC-32 isolated from activated sludge[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 176(1/3): 262-268.
- [12] Wang YY, Miao B, Hou DM, et al. Biodegradation of di-*n*-butyl phthalate and expression of the 3,4-phthalate dioxygenase gene in *Arthrobacter* sp. ZH2 strain[J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(6): 936-940.
- [13] 夏凤毅, 郑平, 周琪, 等. 邻苯二甲酸酯化合物生物降解性与其化学结构的相关性[J]. *浙江大学学报*, 2004, 30(2): 141-146.
- [14] RE 布坎南, NE 杰本斯. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 第8版. 北京: 科学出版社, 1984: 922-934.
- [15] 东秀株, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 370-412.
- [16] 和七一, 赵瑛, 段海龙, 等. 一株产纤溶酶菌株的分离、鉴定及其酶活特征的初步研究[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(8): 1375-1383.
- [17] 李献梅, 王小芬, 杨洪岩, 等. 促旋酶(*gyrase*) B 亚单位基因 *gyrB* 在鉴别细菌近缘种中的应用[J]. *微生物学报*, 2008, 48(5): 701-706.
- [18] Yamamoto S, Harayama S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1995, 61(3): 1104-1109.
- [19] 陈湖星, 杨雪, 张凯, 等. 一株高效 BBP 降解菌的分离与特性研究[J]. *环境科学*, 2013, 34(7): 2882-2888.
- [20] 许丽, 高振, 罗霖, 等. 一株高效降解砒的细菌分离鉴定及其降解效果[J]. *微生物学报*, 2011, 51(3): 313-319.
- [21] 刘庆, 杨红军, 史衍玺, 等. 环境中邻苯二甲酸酯类 (PAEs) 污染物研究进展[J]. *中国生态农业学报*, 2012, 20(8): 968-975.
- [22] Chang BV, Yang CM, Cheng CH, et al. Biodegradation of phthalate esters by two bacteria strains[J]. *Chemosphere*, 2004, 55: 533-538.
- [23] Nakazawa T, Hayashi E. Phthalate and 4-Hydroxy phthalate metabolism in *Pseudomonas testosteroni*: purification and properties of 4,5-Dihydroxy phthalate decarboxylase[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1978, 36(2): 264-269.
- [24] Eaton RW, Ribbons DW. Metabolism of di-butyl phthalate and phthalic acid by *Micrococcus* sp. strain 12B[J]. *Journal of Bacteriology*, 1982, 151(1): 48-57.
- [25] 曹相生, 孟雪征, 任书魁, 等. 一株 DEHP 降解菌的筛选和分子鉴定[J]. *环境科学与技术*, 2011, 34(12): 217-220.
- [26] 秦华林, 先贵, 尹睿, 等. 一株邻苯二甲酸二异辛酯高效降解菌的筛选及其降解特性的初步研究[J]. *农业环境科学学报*, 2005, 24(6): 1171-1175.
- [27] Tuguhhiro N, Makoto I, Takuya I. A mono-2-ethylhexyl phthalate hydrolase from a *Gordonia* sp. that is able to dissimilate di-2-ethylhexyl phthalate[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 73(4): 2394-2399.
- [28] 骆祝华, 黄翔玲, 叶德赞. 环境内分泌干扰物——邻苯二甲酸酯的生物降解研究进展[J]. *应用与环境生物学报*, 2008, 14(6): 890-897.